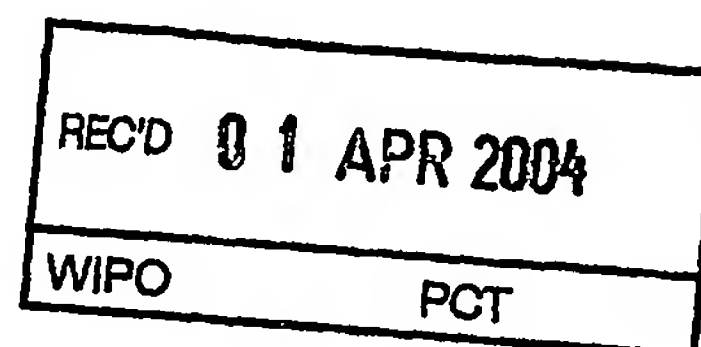


BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen:

103 09 132.7

Anmeldetag:

28. Februar 2003

Anmelder/Inhaber:

Forschungszentrum Jülich GmbH, 52428 Jülich/DE;
Dr. Peter M i e t h e , 06632 Schleberoda/DE.

Erstanmelder: Forschungszentrum Jülich GmbH,
52428 Jülich/DE

Bezeichnung:

Verfahren und Vorrichtung zum selektiven
Nachweis magnetischer Partikel

IPC:

G 01 N 27/72

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 20. Februar 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Zitenzier



27.02.2003

5

B e s c h r e i b u n g

Verfahren und Vorrichtung zum selektiven Nachweis
magnetischer Partikel

Die Erfindung betrifft den Nachweis magnetischer Partikel als Marker an Analyten.

5 Aus dem Stand der Technik sind Nachweisverfahren von Analyten mittels Fluorochromen, Enzymen oder radioaktiver Teilchen als sogenannte Marker für Analyten bekannt. Nachteilig ist der lineare Detektionsbereich von Fluoreszenzmarkern bzw. die Empfindlichkeit enzymatischer Techniken begrenzt. Radioaktive Marker sind aufgrund der Strahlenschutzanforderungen problematisch.

10

Bioassays auf der Basis magnetischer Markierung des Analyten sind hierzu eine Alternative. Die magnetischen Partikel bestehen aus einem Eisenoxid-Kern mit definierten Durchmessern von einigen zehn bis einigen hundert Nanometern. Sie weisen eine biokompatible Oberflächenbeschichtung auf, mit der sie an den Analyten, z. B. an chemische Substanzen, oder an die Oberfläche von Zellen oder Viren in an sich bekannter Weise gebunden werden.

15

20

Vorteilhaft sind derartige Marker stabil, ungiftig und mittels magnetischer Felder manipulierbar. Partikel aus Eisenoxid sind superparamagnetisch. Das Vorhandensein magnetischer Partikel in einem Probenvolumen kann durch Wechselfeld-Suszeptometrie bestimmt werden. Im Falle der Monodispersität, d.h. einheitlicher Partikelgröße,

25

4

kann die Konzentration der Partikel auch quantitativ bestimmt werden.

5

10

Aus US 6,110,660 ist der Nachweis magnetischer Partikel mittels Suszeptometrie bekannt. Dabei wird die magnetische Suszeptibilität eines Analyten mittels einer Maxwell-Brücke im Frequenzbereich um 200 kHz gemessen. Die gemessene elektrische Spannung an einem Ausgangsverstärker der Brücke ist der Suszeptibilität der Lösung proportional. Bei konstanter Partikelgröße ist wiederum die Suszeptibilität proportional zur Anzahl der magnetischen Partikel in Lösung.

15

20

25

Nachteilig ist dieses Verfahren nicht selektiv. Zwar ist die magnetische Suszeptibilität konzentrierter Nanopartikel-Lösungen hoch. Allerdings erfordern Immunoassay-Verfahren in der Regel den Nachweis sehr geringer Konzentrationen von Biomolekülen und dementsprechend sehr geringe Konzentrationen magnetischer Marker-Partikel. Die resultierende Suszeptibilität der Lösung ist dann sehr klein und kaum von der Suszeptibilität einer Vergleichslösung ohne magnetische Partikel zu unterscheiden. Die Erhöhung der Verstärkung am Ausgang der Maxwell-Brücke ist keine brauchbare Lösung dieses Problems, weil parasitäre Effekte wie Suszeptibilitätsvariationen der Probengefäße, der Reagenzien und der Laborumgebung ebenso zu Streuungen in der Ausgangsspannung führen wie thermische Effekte und elektromechanisches Driften der Bauteile der Ausleseschaltung.

Aus US 6,046,585 ist die Bewegung von Magnetpartikel-Proben zur Erzielung einer niederfrequenten Modulation

des Messsignals unter Verwendung eines gradiometrischen SQUID-Magnetfelddetektors bekannt. Nachteilig werden etwaige Signale der Probenhalterung und der Probengefäße mit diesem Verfahren nicht unterdrückt.

- 5 Aufgabe der Erfindung ist es, ein Verfahren zum selektiven Nachweis superpara- und/oder ferromagnetischer Partikel bereit zu stellen, welches mit geringem apparativen Aufwand hochsensitiv solche Partikel nachzuweisen vermag. Aufgabe der Erfindung ist es weiter eine diesbezügliche Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens bereit zu stellen.
- 10

Die Aufgabe wird durch ein Verfahren gemäß Hauptanspruch und durch eine Vorrichtung gemäß Nebenanspruch gelöst. Vorteilhafte Ausgestaltungen ergeben sich aus den darauf jeweils rückbezogenen Patentansprüchen.

15

Zum selektiven Nachweis und/oder zur Quantifizierung superparamagnetischer und/oder ferromagnetischer Partikel wird eine aufgrund der Nichtlinearität der Magnetisierungskennlinie der Partikel erzeugte Frequenzkomponente von Magnetfeldern bei einer Mischfrequenz gemessen.

20

Superpara- und ferromagnetische Stoffe weisen eine nichtlineare Magnetisierungskennlinie auf, eine Eigenschaft, welche erfindungsgemäß zum selektiven Nachweis dieser Stoffe genutzt wird. Das Verfahren nutzt die Abhängigkeit der differentiellen Suszeptibilität, (das heißt die Ableitung der magnetischen Suzeptibilität

25

nach dem Magnetfeld) der Partikel von dem auf die Partikel einwirkenden Magnetfeld, aus.

5 Die Partikel werden mit einem ersten Wechsel-Magnetfeld beaufschlagt. Dies hat eine Aussteuerung der Magnetisierungskennlinie der Partikel zur Folge (Aussteuer-Magnetfeld).

10 Bevorzugt weist das Aussteuer-Magnetfeld eine Frequenz zwischen 50 und 100 Hertz auf. Durch Auswahl solcher niederfrequenter Wechsel-Magnetfelder können niedrige Ströme und Spannungen verwendet werden.

15 Die Partikel werden zudem mit einem zweiten Wechsel-Magnetfeld mit einer zum Aussteuer-Magnetfeld verschiedenen Frequenz beaufschlagt. Das zweite Wechsel-Magnetfeld dient der Abtastung der Nichtlinearität der Magnetisierungskennlinie der Partikel (Abtast-Magnetfeld).

Als Folge tritt ein auf Grund der Einwirkung der beiden Wechsel-Magnetfelder induziertes Antwort-Magnetfeld der magnetischen Partikel auf, welches gemessen wird.

20 Das Abtast-Magnetfeld kann vorteilhaft eine Frequenz zwischen 10 und 100 Kilohertz aufweisen. Dadurch wird im Falle der Verwendung einer Induktionsspule als Magnetfeldsensor vorteilhaft bewirkt, dass die in dieser Spule durch das Antwort-Magnetfeld induzierte Spannung, die der Frequenz des Antwort-Magnetfeldes proportional ist, hoch und damit leichter messbar ist.

25

Die auftretende Amplitudenvariation des Antwort-Magnetfeldes ist primär abhängig von der Art und der Konzentration der magnetischen Partikel. Superpara- und ferromagnetische Stoffe weisen - wie erwähnt - eine nicht-lineare Magnetisierungskennlinie auf. Auf Grund der nicht-linearen Magnetisierungskennlinie lassen sich die genannten Stoffe selektiv nachweisen.

Das Antwort-Magnetfeld weist an einem Sensor Frequenz-Mischkomponenten der beiden auf die magnetischen Partikel beaufschlagten Wechsel-Magnetfelder auf. Eine solche Komponente kann durch geeignete phasenempfindliche Detektion (Demodulation) nachgewiesen werden. Die dadurch erzeugte Spannung entspricht dem Amplitudenverlauf der Komponente und wird als Ausgangssignal zur Bestimmung der Konzentration des Analyten herangezogen.

Besonders vorteilhaft wird der zeitliche Verlauf der Amplitude (Amplitudenvariation) des Antwort-Magnetfeldes durch phasenempfindliche Detektion bei der Frequenz des Abtast-Magnetfeldes gemessen. Im Falle superpara- und ferromagnetischer Analyten weist der zeitliche Verlauf der Amplitude des Antwort-Magnetfeldes Frequenzkomponenten auf, die Vielfache der Frequenz des Aussteuer-Magnetfeldes sind. Besonders ausgeprägt sind geradzahlige Vielfache, und dabei insbesondere die Komponente mit der doppelten Frequenz des Aussteuer-Magnetfeldes.

Der Grund dafür ist, dass das Aussteuer-Magnetfeld zu einer verzerrten magnetischen Induktion der magnetischen Partikel führt. Das zusätzlich aufgebrachte Ab-

5 tast-Magnetfeld hat in dem Falle, dass die durch das Aussteuer-Magnetfeld vorliegende momentane magnetische Induktion gerade einen Nulldurchgang durchläuft, eine große zusätzliche magnetische Induktion zur Folge. In dem Falle, dass die Aussteuer-Induktion gerade ein Betragmaximum aufweist, führt das Abtast-Magnetfeld hingegen nur zu einer kleinen, zusätzlichen Induktion. Die Amplitude wird nämlich durch die Ableitung der Magnetisierungskurve der magnetischen Partikel kontrolliert, die im Falle großer Magnetfelder aufgrund des Sättigungseffektes geringer ist als im Falle kleiner Magnetfelder.

10 Betrachtet man den zeitlichen Verlauf der Amplitude des Antwort-Magnetfeldes bei der Frequenz des Abtast-Magnetfeldes als Funktion der Zeit, so variiert diese Amplitude gerade mit der doppelten Frequenz der Frequenz des Aussteuer-Magnetfeldes. Sie hat ihre Minima bei den Extrema der Aussteuerung und ihre Maxima bei den Nulldurchgängen.

15 Die Amplitudenvariation des Antwort-Magnetfeldes wird zweckmäßig durch phasenempfindliche Detektion demoduliert. Das Antwort-Magnetfeld wird zweckmäßig durch einen Magnetfeldsensor in eine elektrische Spannung gewandelt und gegebenenfalls verstärkt.

20 Die resultierende Ausgangsspannung ist im Falle monodisperser Partikel vorteilhaft linear proportional der Konzentration des Analyten, welche nach Kalibration des Messsystems entsprechend berechnet wird.

9

5 Eine Vorrichtung zum selektiven Nachweis und/oder zur Quantifizierung superparamagnetischer und/oder ferromagnetischer Partikel mittels Messung der differentiellen Suszeptibilität der Partikel, umfasst einen Behälter mit den nachzuweisendem und/oder zu quantifizierenden Partikeln am Analyten. Der Behälter kann aus einem für das Verfahren geeigneten, nicht magnetischen Material, das heißt z. B. aus Glas oder Kunststoff, bestehen.

10 Die Vorrichtung umfasst mindestens einen Oszillator. Der Oszillator ist geeignet, um Frequenzen von Wechsel-Magnetfeldern, wie im vorliegenden Fall nötig, zu erzeugen.

15 Besonders vorteilhaft umfasst die Vorrichtung einen Basisfrequenz-Oszillator, aus dem die Frequenzen des Abtast- und des Aussteuer-Magnetfeldes mittels Frequenzteilern phasenstarr abgeleitet werden.

20 Es können aber auch zwei Oszillatoren zur unabhängigen Erzeugung beider Wechsel-Magnetfelder verwendet werden. Ein erster Oszillator erzeugt dann die Frequenz des Abtast-Magnetfeldes, ein zweiter Oszillator die Frequenz des Aussteuer-Magnetfeldes.

25 Die Vorrichtung weist zu dem mindestens einen Feldgenerator auf. Dieser dient zur Beaufschlagung des Analyten mit den Wechsel-Magnetfeldern. Es können besonders vorteilhaft zwei solcher Feldgeneratoren vorliegen, die den Analyten mit dem ersten bzw. zweiten Wechsel-

Magnetfeld, also des Aussteuer-Magnetfeld und des Ab-
tast-Magnetfeldes, beaufschlagen.

Die Vorrichtung umfasst einen Magnetfeldsensor, der der Aufnahme eines Antwort-Magnetfeldes der Partikel dient. Der Magnetfeldsensor wandelt und verstärkt die Amplitudenvariation des Antwort-Magnetfeldes der Partikel und leitet sie an einen phasenempfindlichen Detektor weiter.

Die Vorrichtung umfasst ferner mindestens einen phasenempfindlichen Detektor, der von einem Oszillator gegebenenfalls über einen Frequenzteiler mit einer Referenzfrequenz gespeist wird. Der phasenempfindliche Detektor ermittelt die Amplitude des Antwort-Magnetfeldes bei dieser Frequenz.

15 Die Vorrichtung kann mindestens einen zweiten phasenempfindlichen Detektor umfassen, der ebenfalls von einem Oszillator gegebenenfalls über einen Frequenzteiler mit einer Referenzfrequenz gespeist wird.

20 In diesem Falle würde der erste phasenempfindliche Detektor zweckmäßigerweise mit der Abtastfrequenz als Referenz gespeist und dementsprechend die Amplitude des Antwortmagnetfeldes bei der Abtastfrequenz liefern. Der zweite phasenempfindliche Detektor würde als Referenz mit einem Vielfachen der Frequenz des Aussteuer-

25 Magnetfeldes gespeist. Der zweite phasenempfindliche Detektor untersucht die Amplitude des Antwort-Magnetfeldes, welche über den ersten phasenempfindlichen Detektor an den zweiten phasenempfindlichen Detektor geleitet wird, auf eine Frequenzkomponente, die

5 einem geradzahligen Vielfachen, insbesondere dem Doppelten der Frequenz des Aussteuer-Magnetfeldes entspricht. Der zweite phasenempfindliche Detektor erzeugt eine Ausgangsspannung, die der Amplitude dieser Frequenzkomponente entspricht.

Zur Maximierung der demodulierten Signale kann die Vorrichtung ferner Phasenschieber an den Referenzeingängen der phasenempfindlichen Detektoren beinhalten.

10 Im weiteren wird die Erfindung an Hand von Ausführungsbeispielen und der beigefügten Figuren 1 bis 8 näher beschrieben.

15 Figur 1 veranschaulicht die zugrundeliegende physikalische Eigenschaft superparamagnetischer und ferromagnetischer Materialien. Derartige Materialien weisen eine nicht-lineare Magnetisierungskennlinie auf (Fig. 1b). Im Gegensatz hierzu weisen diamagnetische und paramagnetische Materialien eine lineare Magnetisierungskennlinie auf (Fig. 1a).

20 Die Substanz werde mit einem Wechselfeld der Frequenz f und der Amplitude H_a beaufschlagt. Ein etwaiges zusätzlich vorhandenes statisches Magnetfeld, z. B. das Erdmagnetfeld, werde mit H_0 bezeichnet.

$$H(t) = H_a \sin(2\pi ft) + H_0 \quad (1)$$

25 Figur 1a stellt die magnetische Aussteuer-Induktion 3 einer paramagnetischen Substanz auf ein Aussteuer-Magnetfeld 1 dar. Eine paramagnetische Substanz ist

charakterisiert durch eine konstante Permeabilität

$\mu = \mu_0 \mu_r$ mit $\mu_r > 1$. Dabei bezeichnet $\mu_0 = 4\pi \cdot 10^{-7} \frac{Vs}{Am}$ die

Permeabilität des Vakuums und μ_r die relative Permeabilität oder Permeabilitätszahl des Materials. Die resultierende magnetische Aussteuer-Induktion 3

$$B(t) = \mu_0 \mu_r H_a \sin(2\pi f t) + \mu_0 \mu_r H_0 \quad (2)$$

ist, wie in Figur 1a gezeigt, unverändert sinusförmig. Ein paramagnetisches Material mit einer linearen Magnetisierungskennlinie 2 liefert also eine unverzerrte Antwort. Das gleiche gilt entsprechend für diamagnetische Materialien mit konstanter relativer Permeabilität $\mu_r < 1$.

Superparamagnetische Substanzen weisen die erwähnte nicht-lineare und nicht-hysteretische Magnetisierungskennlinie 5 auf. Die Magnetisierung $M(H)$ superparamagnetischer Substanzen lässt sich im allgemeinen durch die Formel

$$M(H) = M_s L \left(\frac{\mu_0 H}{B_c} \right) \quad (3)$$

beschreiben. Dabei bezeichnet

$$L(x) = \coth(x) - \frac{1}{x} \quad (4)$$

die Langevin-Funktion, B_c die charakteristische Induktion, M_s die Sättigungsmagnetisierung der Partikel und $x = \frac{\mu_0 H}{B_c}$ das Argument der Langevin-Funktion.

Die typische magnetische Antwort eines superparamagnetischen Materials ist durch die verzerrte Sinusfunktion als magnetische Aussteuer-Induktion 6 in Fig. 1b dargestellt und lässt sich im allgemeinen durch Einsetzen von Formel (1) in Formel (3) gemäß Formel (5) beschreiben:

$$B(t) = M_s \cdot L \left(\frac{\mu_0}{B_c} [H_a \sin(2\pi f t) + H_0] \right) \quad (5)$$

Erfindungsgemäß wird ein Aussteuer-Magnetfeld 4 zur Aussteuerung der Magnetisierungskennlinie 5 verwendet. Das Aussteuer-Magnetfeld 4 ist ein Wechsel-Magnetfeld mit bestimmter Frequenz f .

Zusätzlich wird der Analyt mit einem zweiten Wechsel-Magnetfeld (nicht dargestellt), einem sogenannten Abtast-Magnetfeld, beaufschlagt. Die Frequenz des Abtast-Magnetfeldes wird verschieden von der Frequenz des Aussteuer-Magnetfeldes 4 gewählt.

Figur 2 erläutert das dem Verfahren zugrunde liegende Prinzip. Figur 2b kennzeichnet den Fall eines superparamagnetischen oder ferromagnetischen Analyten und Fig. 2a den eines diamagnetischen oder paramagnetischen Analyten. Das Aussteuer-Magnetfeld 4 führt, wie in Fig. 1 gezeigt, zu einer verzerrten magnetischen Aussteuer-

5

Induktion 6, deren zeitliche Abhängigkeit durch Formel (5) beschrieben wird. Das zusätzlich aufgebraachte zweite Wechsel-Magnetfeld führt als Abtast-Magnetfeld in dem Falle, dass die durch das Aussteuer-Magnetfeld 4 erzeugte magnetische Aussteuer-Induktion 6 seinen Null-durchgang durchläuft, zu einer großen zusätzlichen Abtast-Induktion bei der Frequenz des Abtast-Magnetfeldes (Figur 2b, Nr. 9).

10

In dem Falle, dass die durch das erste Wechsel-Magnetfeld (Aussteuer-Magnetfeld 4) erzeugte Induktion 6 ein Betragsmaximum aufweist, führt das Abtast-Magnetfeld nur zu einer kleinen zusätzlichen Induktion (Figur 2b, Nr. 10).

15

Die Amplitude des Antwort-Magnetfeldes 11 wird nämlich durch die Ableitung der Magnetisierungskennlinie kontrolliert. Im Falle superparamagnetischer oder ferromagnetischer Substanzen ist diese Steigung der Magnetisierungskennlinie im Falle großer Magnetfelder $|H|$ erheblich kleiner als im Ursprung bei $H = 0$. Für superparamagnetische Substanzen mit einer Magnetisierungskennlinie gemäß Gleichung (5) ergibt sich diese Aussage durch Betrachten der Ableitung der Langevin-Funktion,

20

$$\frac{dL(x)}{dx} = 1 - \coth(x)^2 - \frac{1}{x^2} \quad (6)$$

25

die für große $|x|$ erheblich kleiner ist als im Ursprung bei $x = 0$.

15

5

Stellt man den Verlauf der Amplitude 11 der magnetischen Induktion, das heißt des Antwort-Magnetfeldes, bei der Frequenz des Abtast-Magnetfeldes als Funktion der Zeit dar, so erkennt man, dass diese Amplitude 11 gerade mit der doppelten Frequenz des Aussteuer-Magnetfeldes 4 variiert. Sie hat ihre Minima bei den Extrema und ihre Maxima bei den Nulldurchgängen des Aussteuer-Magnetfeldes 4 bzw. der magnetischen Aussteuer-Induktion 6.

10

Im Falle eines paramagnetischen Analyten erhält man aufgrund der linearen Magnetisierungskennlinie 2 in Figur 1 eine unverzerrte magnetische Induktion 3 durch das Aussteuer-Magnetfeld 1. Somit erhält man eine gleichbleibende Amplitude 8 der zusätzlichen Induktion 7 aufgrund des Abtast-Magnetfeldes unabhängig davon, welchen Wert das Aussteuer-Magnetfeld 1 bzw. die Aussteuer-Induktion 3 gerade annimmt (Figur 2a, Nr. 7). Die entsprechende Amplitude 8 der magnetischen Induktion bei der Frequenz des Abtast-Magnetfeldes ist zeitlich konstant.

15

20

25

30

Neben der doppelten Frequenz der Frequenz des Aussteuer-Magnetfeldes 4 (bzw. Aussteuer-Induktion 6) enthält die Amplitude 11 des Aussteuer-Magnetfeldes 4 bei der Frequenz des Abtast-Magnetfeldes auch höhere Harmonische der Frequenz des Aussteuer-Magnetfeldes 4. Bei einer symmetrischen Aussteuerung der Magnetisierungskennlinie 5 (d.h. $H_0 = 0$) findet man allerdings nur Frequenzkomponenten bei geradzahligen Vielfachen der Frequenz des Aussteuer-Magnetfeldes 4. Bringt man zusätzlich ein statisches Gleichfeld H_0 auf den Analyten

16

auf, so erhält man zusätzliche Frequenzkomponenten bei ungeradzahligen Vielfachen der Frequenz des Aussteuer-Magnetfeldes.

5

Das Verfahren weist den Vorteil auf, daß nur Analyten mit nicht-linearer Magnetisierungskennlinie 5 eine zeitliche Variation der Amplitude 11 zeigen, wie in Fig. 2b gezeigt. Paramagnetische oder diamagnetische Substanzen mit linearer Magnetisierungskennlinie 2 hingegen weisen eine konstante Amplitude 8 der magnetischen Induktion bei der Frequenz des Abtast-Magnetfeldes auf (Fig. 2a). Diese Selektivität zeichnet das erfindungsgemäße Verfahren gegenüber den Verfahren gemäß Stand der Technik aus, die nicht unterscheiden, ob die gemessene Suszeptibilität von einem dia- bzw. paramagnetischen oder einem super- bzw. ferroparamagnetischen Material herrührt.

10

15

20

Figur 3 zeigt eine erste Vorrichtung zum selektiven Nachweis und/oder zur Quantifizierung superpara- und/oder ferromagnetischer Partikel an Analyten. Die Bauteile sind so konfiguriert, dass eine aufgrund der Nichtlinearität der Magnetisierungskennlinie 5 der Partikel erzeugte Frequenz-Komponente der Magnetfelder 15, 18 bei einer Mischfrequenz gemessen wird.

25

Erforderlich sind ein geeigneter Behälter 12, in dem sich ein Analyt in einem Meßvolumen befindet. Der Analyt kann durch an sich bekannte Verfahren wie selektive Physisorptionsreaktion, Chemisorptionsreaktion, Präzipitation, Filtration, oder Extraktion in den Behälter 12 eingebracht werden. An den Analyten sind nachzuwei-

sende superpara- und/oder ferromagnetischen Partikel gekoppelt.

Ein Oszillator 16 erzeugt die Frequenz des Aussteuer-Magnetfeldes 18, welches mittels eines Feldgenerators 17 dem Analyten beaufschlagt wird.

Ein Oszillator 13 erzeugt die Frequenz eines zweiten Wechsel-Magnetfeldes, des Abtast-Magnetfeldes 15, welches mittels eines weiteren Feldgenerators 14 dem Analyten beaufschlagt wird.

Das von den Partikeln bzw. Analyten ausgehende Antwort-Magnetfeld 19 wird von einem Magnetfeldsensor 20 in eine elektrische Spannung gewandelt und vorverstärkt.

Ferner umfasst die Vorrichtung einen ersten phasenempfindlichen Detektor 21, der die Frequenz des Abtast-Magnetfeldes 15 vom Oszillator 13 als Referenz eingespeist bekommt. Dieser phasenempfindliche Detektor 21 ermittelt den zeitlichen Verlauf der Amplitude (s. Fig. 2, Nr. 11 bzw. 8) des Antwort-Magnetfeldes 19 bei der Frequenz des Abtast-Magnetfeldes 15. Diese Amplitude 11 bzw. 8 wird durch einen zweiten phasenempfindlichen Detektor 23, der durch Oszillator 16 die Frequenz des Aussteuer-Magnetfeldes 18 über einen m -fachen Frequenzvervielfacher 22 als Referenz gespeist bekommt, auf eine Frequenzkomponente untersucht, die dem m -fachen Vielfachen der Frequenz des Aussteuer-Magnetfeldes 18 entspricht, mit einer ganzen, positiven Zahl m . Bevorzugt wird m gerade gewählt, besonders bevorzugt ist $m = 2$. Die erzeugte Ausgangsspannung 24 entspricht der Amp-

litude dieser Frequenzkomponente. Es wird eine Frequenz-Komponente bei einer Mischfrequenz gemessen, die nur bei Vorliegen einer Nichtlinearität der Magnetisierungskennlinie der Partikel auftritt.

5 Sofern die Detektionskette 19 bis 23 linear arbeitet, ist die Ausgangsspannung 24 linear vom superparamagnetischen/ferromagnetischen Moment im Probenvolumen von Behälter 12 abhängig.

10

Bei konstantem Moment der Einzel-Magnetpartikel im Analyten und konstantem Messvolumen ist die Konzentration der magnetischen Marker in der Probe proportional zur Ausgangsspannung 24. Die Amplitude des Aussteuer-Magnetfeldes 18 wird in vorteilhafter Weise derart gewählt, dass der Analyt in die magnetische Sättigung getrieben wird. Im Falle superparamagnetischer Partikel, deren Magnetisierungskennlinie durch Gleichung (3) beschreibbar ist, wird die Amplitude des Aussteuer-Magnetfeldes 18 in der Größenordnung des charakteristischen Feldes B_c der verwendeten superparamagnetischen Partikel gewählt. Die Krümmung der der Magnetisierungskennlinie (Gleichung 3) zugrundeliegenden Langevin-Funktion

15

20

$$\frac{d^2 L(x)}{dx^2} = -2 \coth(x) \cdot (1 - \coth(x)^2) - \frac{2}{x^3} \quad (7)$$

25

hat ihr Betragsmaximum bei $x = 1,37$. Besonders vorteilhaft ist also eine Amplitude des Aussteuer-Magnetfeldes 18 von $\mu_0 H_a = 1,37 B_c$. Die Frequenz des Aussteuer-Magnetfeldes 18 wird zur Aussteuerung der Magnetisie-

5

rungskennlinie 5 in vorteilhafter Weise niedrig gewählt, z. B. zwischen 50 Hz und 100 Hz, denn zur Erzeugung von Feldern derart niedriger Frequenzen können Spulen mit hoher Windungszahl und dementsprechend niedrige Ströme und Spannungen verwendet werden. Das Abtast-Magnetfeld 15 wird in vorteilhafter Weise hochfrequent gewählt, z. B. zwischen 10 kHz und 100 kHz. Insbesondere bei der Verwendung von Induktionsspulen als Magnetfeldsensoren 20 hat eine hohe Frequenz des zweiten Magnetfeldes den Vorteil, dass die der Frequenz proportionale induzierte Spannung 24 in der Messspule 20 hoch ist.

10

Ein etwaiges statisches Umgebungs-Gleichfeld wird in vorteilhafter Weise möglichst klein gewählt.

15

Figur 4 skizziert eine alternative Vorrichtung. Ein Quarzoszillator 25 wird zur Erzeugung einer Frequenz verwendet, die mittels dreier Frequenzteiler 26, 27 und 28 heruntergeteilt wird. Die Teilungsverhältnisse der drei Teiler 26, 27 und 28 werden derart gewählt, dass sie jeweils

20

$$\frac{1}{\ell}, \frac{1}{m \cdot n} \text{ und } \frac{1}{n}$$

25

mit ganzen, positiven Zahlen ℓ und n betragen. Die ganze, positive Zahl m bezeichnet das Vielfache der Aussteuer-Frequenz, das demoduliert wird. In vorteilhafter Weise wird m gerade, in besonders vorteilhafter Weise wird $m = 2$ gewählt. Die Feldgeneratoren 17 und 14 erzeugen das Aussteuer-Magnetfeld 18 und das Abtast-

2c

5 Magnetfeld 15. Das Antwort-Magnetfeld 19 wird über eine
differentielle, das heißt gradiometrische Induktions-
spule als Magnetfeldsensor 20 aufgenommen. Die Spule
ist derart angefertigt, dass sie aus zwei identisch ge-
fertigten, aber jeweils gegensinnig gewickelten, in Se-
rie geschalteten Teilspulen besteht, wobei der Analyt
im Behälter 12 nur in eine der beiden Teilspulen einge-
taucht wird. Damit wird vorteilhaft erreicht, dass der
parasitäre Effekt der direkten Induktion einer elektri-
schen Spannung bei der Abtastfrequenz gering gehalten
wird, so dass die Amplitude des Abtast-Magnetfeldes 15
sehr hoch gewählt werden kann, ohne dass eine Übersteu-
10 erung des Vorverstärkers des Magnetfeldsensors 20 ein-
tritt. Auf diese Weise wird eine Steigerung der Emp-
findlichkeit der Apparatur erreicht.

15 Ferner beinhaltet die Vorrichtung einen ersten phasen-
empfindlichen Detektor 21, der die Frequenz des Abtast-
Magnetfeldes 15 vom Frequenz-Teiler 26 als Referenz
eingespeist bekommt und der den zeitlichen Verlauf der
20 Amplitude (s. Fig. 2, Nr. 11 bzw. Nr. 8) des Antwort-
Magnetfeldes 19 bei der Frequenz des Abtast-
Magnetfeldes 15 ermittelt. Diese Amplitude 11 bzw. 8
wird durch einen zweiten phasenempfindlichen Detektor
23, auf eine Frequenzkomponente untersucht, die dem m -
fachen Vielfachen der Frequenz des Aussteuer-
25 Magnetfeldes 18 entspricht, mit einer ganzen, positiven
Zahl m . Diese Referenzfrequenz wird im Ausführungsbei-
spiel der Figur 4 von einem Frequenz-Teiler 28 direkt
aus der Frequenz des Oszillators 25 heruntergeteilt,
30 anstelle, wie im Beispiel der Figur 3, einen Frequenz-
vervielfacher einsetzen zu müssen. In vorteilhafter
Weise sind auf diese Weise alle drei Frequenzen phasen-

starr gekoppelt, so dass ein etwaiger Oszillatordrift unerheblich für die Messung ist.

Nach den beiden phasenempfindlichen Detektoren 21 und 23 steht die Ausgangsspannung 24 als Messsignal zur Verfügung.

Figur 5 skizziert eine weitere Vorrichtung. Ein Quarz-
oszillator 25 wurde als Frequenzbasis verwendet, die
mittels dreier Frequenzteiler 29, 30 und 28 herunterge-
teilt wurde. Die Teilungsverhältnisse der drei Teiler
29, 30 und 28 werden derart gewählt, dass sie jeweils

$$\frac{1}{n+m}, \frac{1}{n(n+m)} \text{ und } \frac{1}{n}$$

mit ganzen, positiven Zahlen m und n betragen. Dabei bezeichnet m wieder das Vielfache der Aussteuer-
Frequenz. In vorteilhafter Weise wird m gerade, in be-
sonders vorteilhafter Weise wird $m = 2$ gewählt. Die
Vorrichtung aus Figur 5 beinhaltet nur einen phasenemp-
findlichen Detektor 21, der die n -fach heruntergeteilte
Frequenz des Oszillator 25 als Referenz eingespeist be-
kommt. Dieser phasenempfindliche Detektor 21 ermittelt
den zeitlichen Verlauf der gleichen Magnetfeldkomponen-
te wie in den beiden vorher vorgestellten Ausführungs-
beispielen aus Fig. 3 und 4.

Experimentell wurden Proben verschiedener Konzentratio-
nen von Magnetpartikeln hergestellt und vermessen. Dazu
wurde eine Lösung von kolloidalen Eisenoxid-Partikeln
im Nanometer-Größenbereich hergestellt und seriell mit

isotonischer Kochsalzlösung (PBS) verdünnt. Figur 6 zeigt die gemessene Ausgangsspannung mit Standardabweichung als Funktion der Eisen-Konzentration der Proben.

Figur 7 zeigt, wie die Messsignale einer Probe fester Konzentration in Abhängigkeit von einem statischen Umgebungsgleichfeld H_0 variieren. Maximale Ausgangsspannung erhält man bei minimalem Gleichfeld. Bei einer Gleichfeldamplitude von etwa 1,9 mT beobachtet man ein Minimum der Ausgangsspannung, für höhere Gleichfelder steigt das Signal wieder an. Rechnerisch lässt sich zeigen, dass das Signal einen Verlauf wie die dritte Ableitung der Langevin-Funktion

$$\frac{d^3 L(x)}{dx^3} = -2(1 - \coth(x)^2)^2 + 4\coth(x)^2 \cdot (1 - \coth(x)^2) + \frac{6}{x^4} \quad (8)$$

haben sollte. In Figur 7 ist vergleichsweise diese Funktion mit skaliertter Amplitude und angepasstem charakteristischen Feldwert $B_c = 1,4$ mT ($x = \mu_0 H / B_c$) eingezeichnet. Die Übereinstimmung mit den Messwerten ist insbesondere für kleine statische Gleichfelder H_0 beeindruckend gut.

Figur 8 stellt die gemessene Abhängigkeit der Ausgangsspannung einer Probe fester Konzentration in Abhängigkeit von der Amplitude des Aussteuer-Magnetfeldes dar. Durch Integration über den amplitudenabhängigen Signalverlauf wurde das zu erwartende Signal berechnet und in Fig. 8 eingetragen. Die Übereinstimmung mit den Messwerten ist insbesondere für kleine Amplituden gut.

2

Das erfindungsgemäße Verfahren/Vorrichtung kann insbesondere für folgende Anwendungen verwendet werden:

- 5 Nachweis von chemischen Substanzen, Zellen oder Viren über die quantitative Erfassung der molekularen Wechselwirkung, insbesondere die Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung, die Antigen-Antikörper-Wechselwirkung und die Wechselwirkung zwischen Oligonucleotiden, wobei die superpara- und/oder ferromagnetischen Partikel an die Substanzen, Zellen oder auch Viren gekoppelt sind.

24

Bezugszeichenliste

	1, 4, 18	Aussteuer-Magnetfeld
	2	Magnetisierungskennlinie, linear
	3	Magnetische Aussteuer-Induktion bei li-
5		nearer Magnetisierungskennlinie
	5	Magnetisierungskennlinie, nicht-linear
	6	Magnetische Aussteuer-Induktion bei
		nicht-linearer Magnetisierungskennlinie
	7	zusätzliche Abtast-Induktion bei linea-
10		rer Magnetisierungskennlinie
	8	Amplitude der magnetischen Induktion
		bei der Frequenz des Abtast-Magnet-
		feldes bei linearer Magnetisierungs-
		kennlinie
15	9, 10	zusätzliche Abtast-Induktion bei nicht-
		linearer Magnetisierungskennlinie bei
		Nulldurchgängen (9) und Extrema (10)
	11	Amplitude der magnetischen Induktion
20		bei der Frequenz des Abtast-Magnet-
		feldes bei nicht-linearer Magnetisie-
		rungskennlinie
	13, 16, 25	Oszillator
	14, 17	Feldgenerator
	15	Abtast-Magnetfeld
25	19	Antwort-Magnetfeld
	20	Magnetfeldsensor
	21, 23	phasenempfindlicher Detektor
	24	Ausgangsspannung
	26, 27, 28,	Frequenz-Teiler
30	29, 30	

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Verfahren zum selektiven Nachweis und/oder zur Quantifizierung superparamagnetischer und/oder ferromagnetischer Partikel,
dadurch gekennzeichnet, dass
5 eine aufgrund der Nichtlinearität der Magnetisierungskennlinie der Partikel erzeugte Frequenzkomponente von Magnetfeldern bei einer Mischfrequenz gemessen wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1,
10 ~~dadurch gekennzeichnet, dass~~
die Partikel zur Aussteuerung ihrer Magnetisierungskennlinie (5) mit einem Aussteuer-Magnetfeld (4, 18) gegebener Frequenz beaufschlagt werden.
3. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
15 bei dem das Aussteuer-Magnetfeld (4, 18) eine Frequenz zwischen 50 und 100 Hertz aufweist.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass
20 die Partikel mit einem Abtast-Magnetfeld (15) mit einer zum Aussteuer-Magnetfeld (4, 18) verschiedenen Frequenz beaufschlagt werden.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
bei dem das Abtast-Magnetfeld (15) eine Frequenz zwischen 10 und 100 Kilohertz aufweist.
- 25 6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass

ein auf Grund der Einwirkung der beiden Wechsel-Magnetfelder (15, 18) induziertes Antwort-Magnetfeld (19) der Partikel gemessen wird.

5 7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Amplitudenvariation (8, 11) des Antwort-Magnetfeldes (19) bei der Frequenz des Abtast-Magnetfeldes (15) gemessen wird.

10 8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die Frequenzkomponente der Amplitudenvariation (8, 11) des Antwort-Magnetfeldes (19) bei der Frequenz des Abtast-Magnetfeldes (15) gemessen wird, die ein ganzzahliges Vielfaches der Frequenz des Aussteuer-Magnetfeldes (4, 18) beträgt.

15 9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die Frequenzkomponente der Amplitudenvariation (8, 11) des Antwort-Magnetfeldes (19) bei der Frequenz des Abtast-Magnetfeldes (15) gemessen wird, die ein geradzahliges Vielfaches der Frequenz des Aussteuer-Magnetfeldes (4, 18) beträgt.

20 10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die Frequenzkomponente der Amplitudenvariation (8, 11) des Antwort-Magnetfeldes (19) bei der Frequenz des Abtast-Magnetfeldes (15) gemessen wird, die das Doppelte der Frequenz des Aussteuer-Magnetfeldes (4, 18) beträgt.

25 11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Amplitudenvariation (11) des Antwort-

Magnetfeldes (19) gewandelt und als Ausgangsspannung (24) zur Bestimmung der Konzentration des Analyten verwendet wird.

5

12. Vorrichtung zum selektiven Nachweis und/oder zur Quantifizierung superparamagnetischer und/oder ferromagnetischer Partikel an Analyten umfassend:

10

- einen Behälter (12) mit nachzuweisendem und/oder zu quantifizierenden Analyten,
- mindestens einen Oszillator (13, 16; 25), zur Erzeugung von Frequenzen von Wechsel-Magnetfeldern (15, 18),

- mindestens einen Feldgenerator (14, 17) zur Beaufschlagung des Analyten mit Wechsel-Magnetfeldern (15, 18),

15

- einen Magnetfeldsensor (20), zur Messung eines Antwort-Magnetfeldes (19) der Partikel, sowie
- mindestens einen phasenempfindlichen Detektor (21, 23).

20

13. Vorrichtung nach Anspruch 12, umfassend

- mindestens einen Frequenz-Teiler (26, 27, 28, 29, 30) zur Teilung der Frequenz des Oszillators (25).

25

14. Vorrichtung nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß

- der oder die Frequenz-Teiler (26, 27, 28, 29, 30) die Oszillator-Frequenz im Verhältnis ganzer, positiver Zahlen teilen.

15. Vorrichtung nach Anspruch 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, dass

die Frequenz-Teiler (26, 27, 28) die Oszillator-Frequenz in den Verhältnissen

$$\frac{1}{\ell}, \frac{1}{m \cdot n} \text{ und } \frac{1}{n}$$

teilen.

5

16. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 13 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Frequenz-Teiler (28, 29, 30) die Oszillator-Frequenz in den Verhältnissen

$$\frac{1}{n}, \frac{1}{n+m} \text{ und } \frac{1}{n(n+m)}$$

teilen.

10

17. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche 15 oder 16, mit ganzen, positiven Zahlen für ℓ , m und n .

15

18. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche 15 bis 17, mit m als gerader Zahl, insbesondere mit $m = 2$.

19. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche 13 bis 18, die mindestens eine in einem Frequenz-Teiler (26, 28) heruntergeteilte Oszillator-Frequenz als Referenz in mindestens einen phasenempfindlichen Detektor (21, 23) einspeist.

20

20. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche 13 bis 19, die eine im Frequenz-Teiler (26) heruntergeteilte Oszillator-Frequenz als Referenz in einen phasen-

25

26

27

empfindlichen Detektor (21) und die eine im Frequenz-Teiler (28) heruntergeteilte Oszillator-Frequenz als Referenz in einen phasenempfindlichen Detektor (23) einspeist.

- 5 21. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche 13 bis 20,
gekennzeichnet durch,
Feldgeneratoren (14, 17), die durch die Frequenzen der Frequenz-Teiler (26, 27; 29, 30) angesteuert werden.

10

22. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche 12 bis 21,
umfassend mindestens einen Frequenzvervielfacher (22).

- 15 23. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche 12 bis 22,
dadurch gekennzeichnet, dass
der Magnetfeldsensor (20) differentiell ausgebildet ist.

20

24. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche 12 bis 23,
dadurch gekennzeichnet, dass
der Magnetfeldsensor (20) zwei Teilspulen gleicher Bauart umfasst.

25

25. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche 12 bis 24,
dadurch gekennzeichnet, dass

die Teilspulen des Magnetfeldsensors (20) gegenseitig gewickelt sind.

5

26. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche 12 bis 25,
dadurch gekennzeichnet, dass
die Teilspulen des Magnetfeldsensors (20) in Serie geschaltet sind.

10

27. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche 12 bis 26,
dadurch gekennzeichnet, dass
der Behälter (12) mit den Analyten nur mit einem
der beiden Teilspulen des Magnetfeldsensors (20) in
Kontakt steht.

2

Z u s a m m e n f a s s u n g

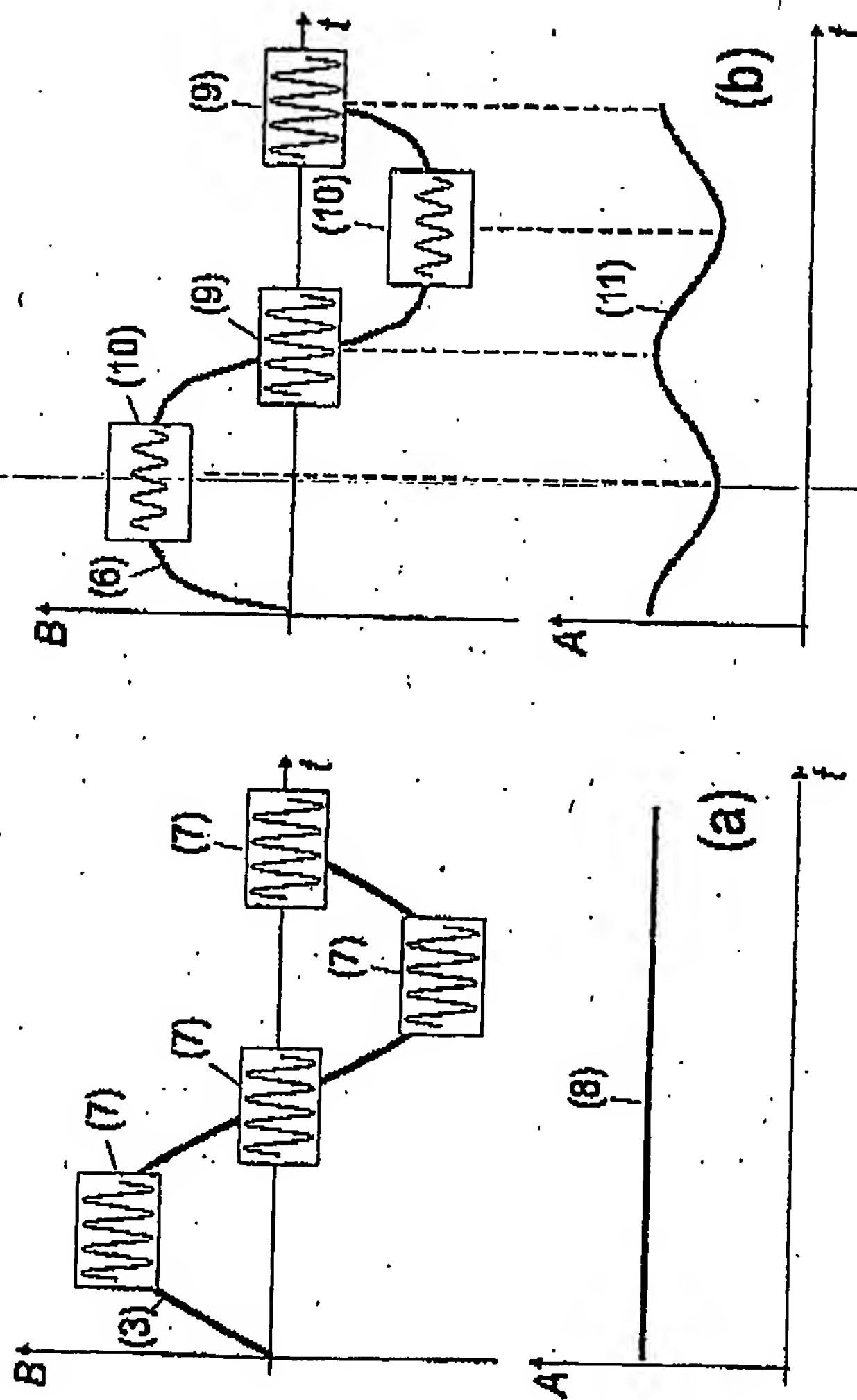
Die Erfindung beschreibt ein Verfahren zum selektiven Nachweis und/oder zur Quantifizierung superparamagnetischer und/oder ferromagnetischer Partikel an Analyten.

5 Das Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, dass eine aufgrund der Nichtlinearität der Magnetisierungskennlinie der Partikel erzeugte Frequenz-Komponente von Magnetfeldern (15, 18) bei einer Mischfrequenz gemessen wird.

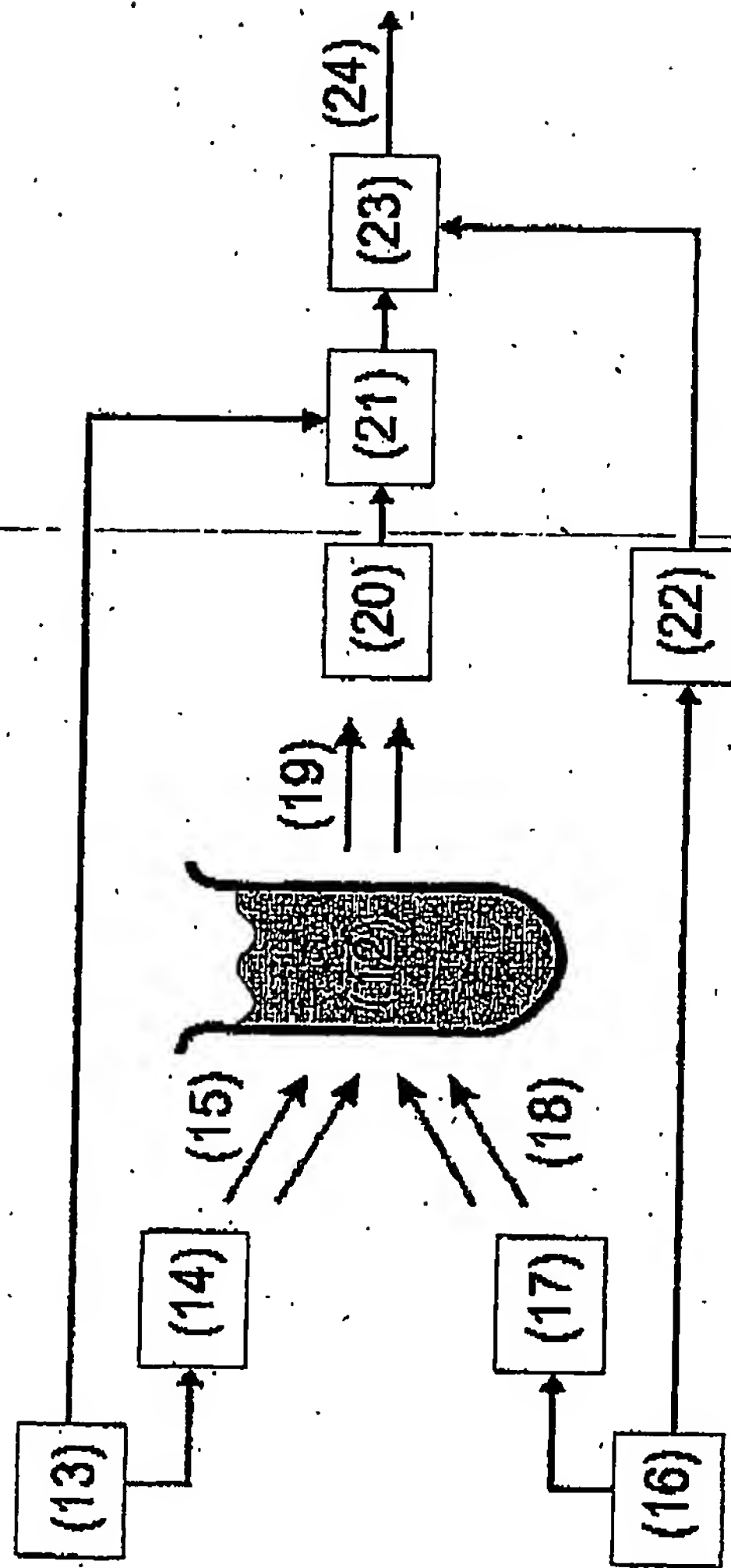
10 Eine Vorrichtung zum selektiven Nachweis und/oder zur Quantifizierung superparamagnetischer und/oder ferromagnetischer Partikel an Analyten umfasst:

- einen Behälter (12) mit nachzuweisendem und/oder zu quantifizierenden Partikeln am Analyten,
- 15 - mindestens einen Oszillator (13, 16; 25), zur Erzeugung von Frequenzen von Wechsel-Magnetfeldern (15, 18),
- mindestens einen Feldgenerator (14, 17) zur Beaufschlagung des Analyten mit Wechsel-Magnetfeldern (15, 20 18),
- einen Magnetfeldsensor (20), zur Messung eines Antwort-Magnetfeldes (19) der Partikel,
- mindestens einen phasenempfindlichen Detektor (21, 23),

25 wobei die Bauteile so konfiguriert sind, dass eine aufgrund der Nichtlinearität der Magnetisierungskennlinie der Partikel erzeugte Frequenz-Komponente der Magnetfelder (15, 18) bei einer Mischfrequenz gemessen wird.

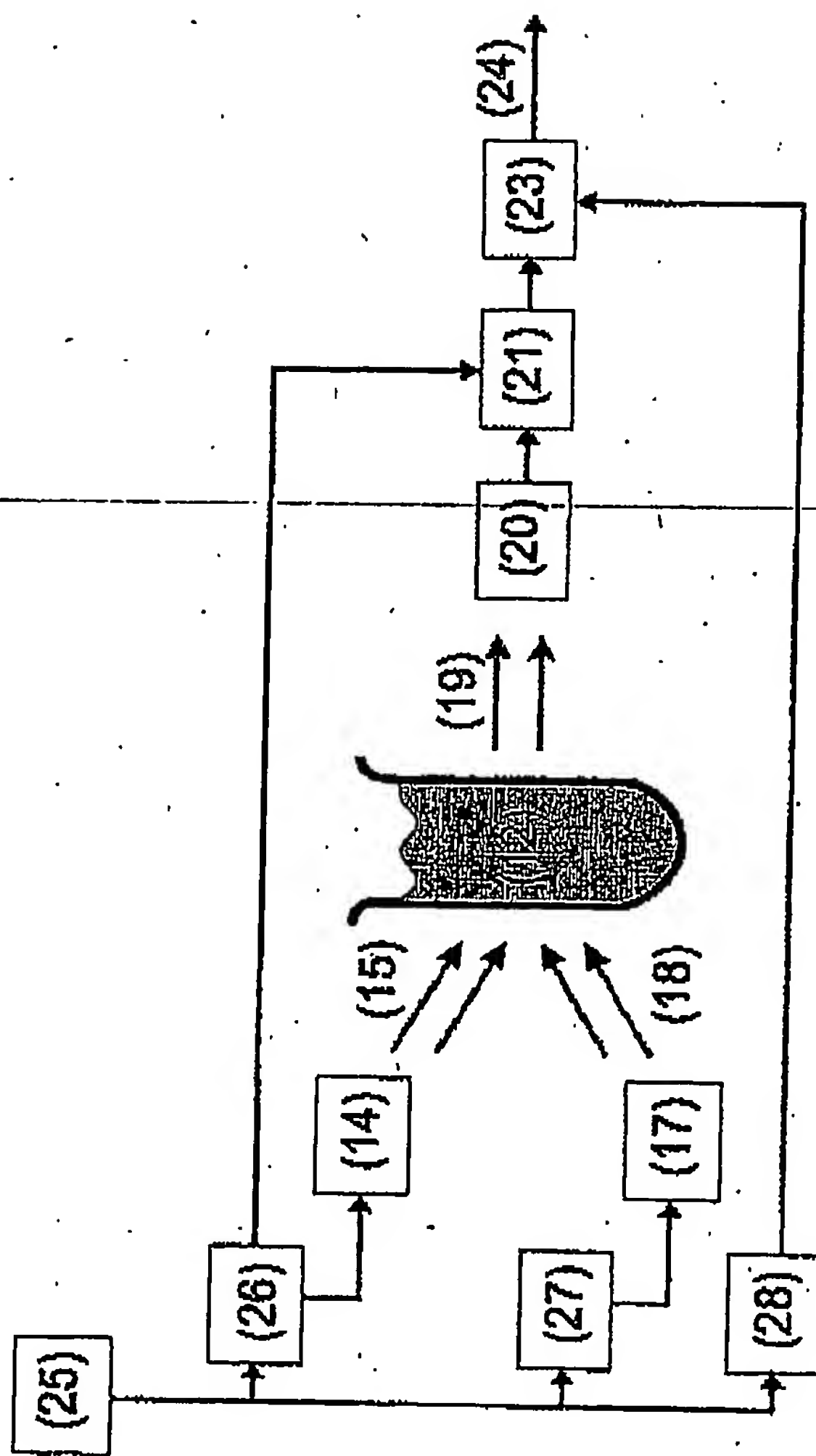


FIGUR 2

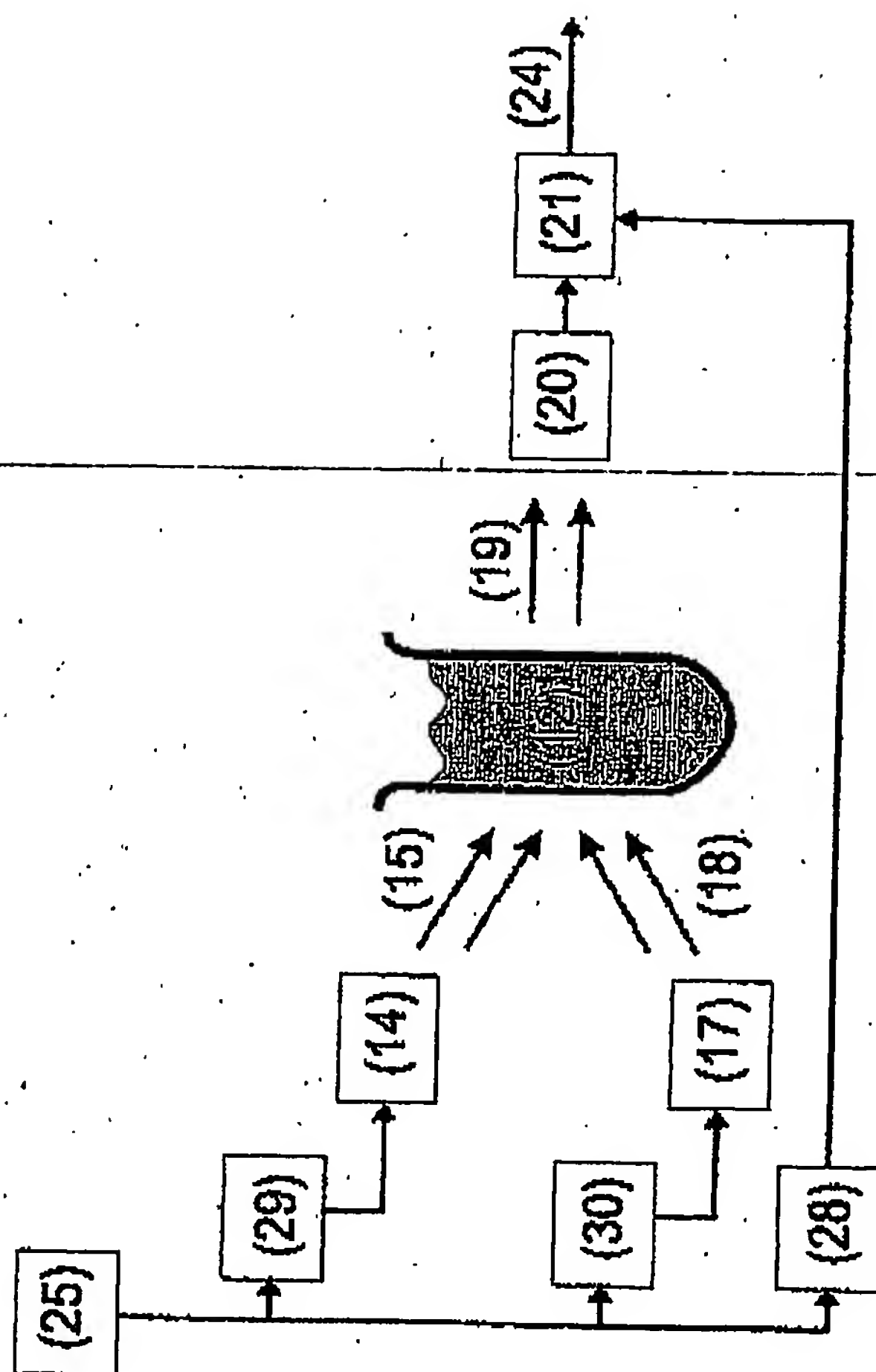


FIGUR 3

24

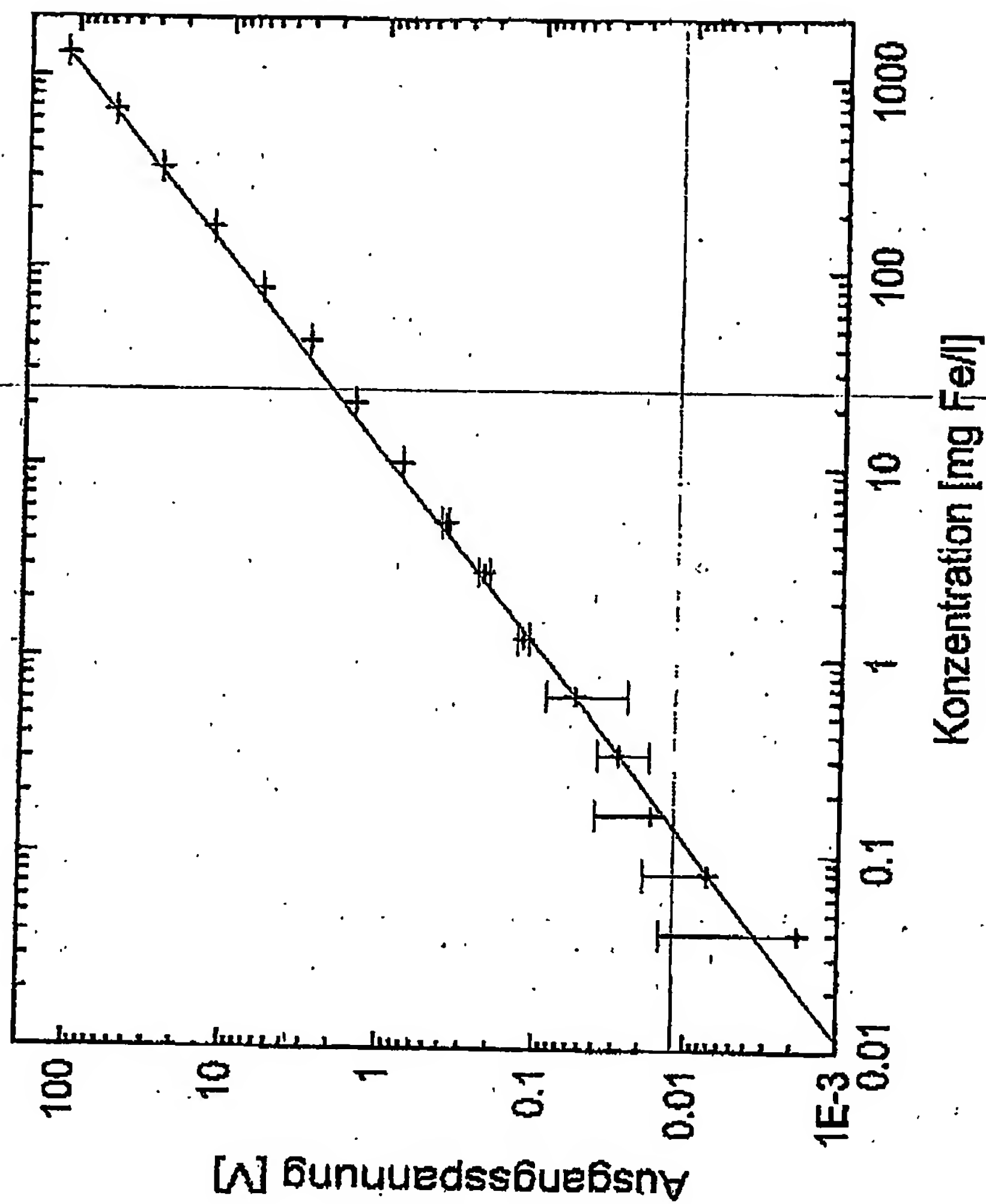


FIGUR 4

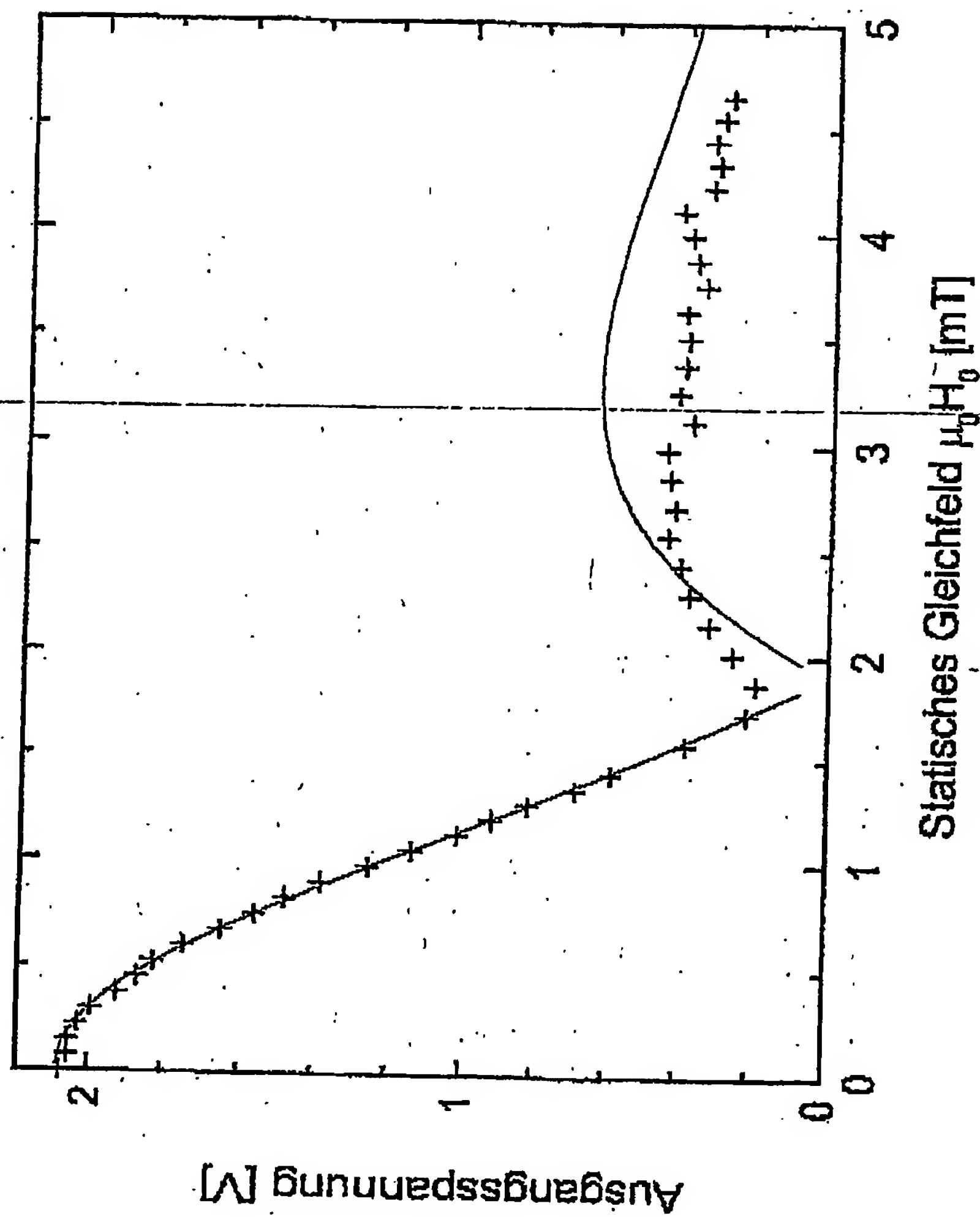


FIGUR 5

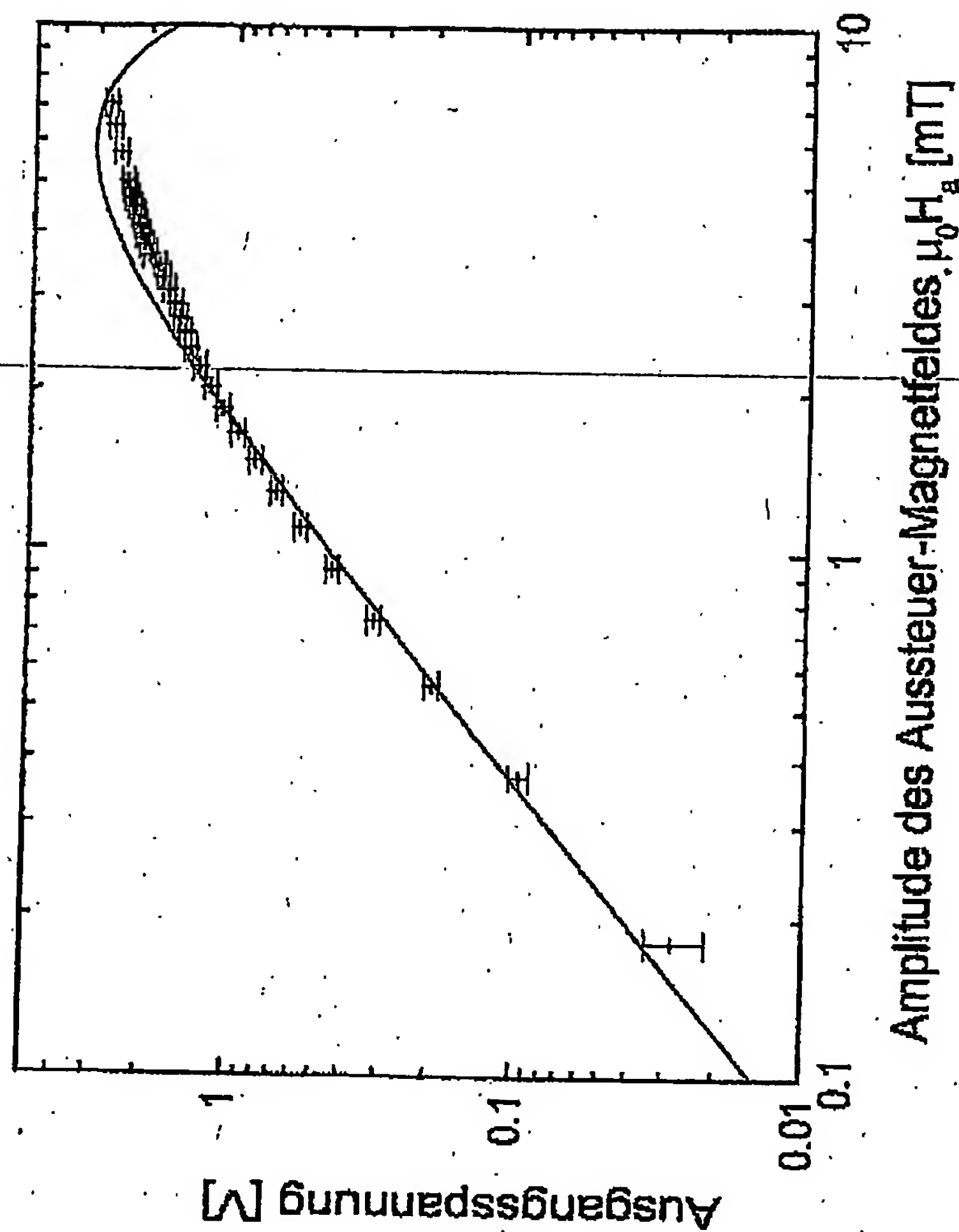
36



FIGUR 6



FIGUR 7



FIGUR 8

This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images
problems checked, please do not report the
problems to the IFW Image Problem Mailbox**